

立体特異的方法과 ^{13}C -NMR 技法에 의한 잣기름의 트리아실 글리세롤의 構成脂肪酸의 分布에 관한 研究

馬孝京 · 金成眞 · 趙鏞桂

東亞大學校 食品營養學科

Studies on the Fatty Acid Distribution in the Position of
Triacylglycerols from the Seed of Pinus Koraiensis by Stereo-specific
Analysis and ^{13}C -NMR Techniques

Woo, Hyo-Kyeng, Kim, Seung-Jin and Joh, Yong-Goo

Dep. of Food Science & Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

ABSTRACT

All the triacylglycerols including the molecular species having Δ^5 -unsaturated fatty acids from the seeds of Pinus Koraiensis, were split into a mixture of diacylglycerols by a Grignard reagent prepared with allyl bromide without arousing acyl chains of a glycerol moiety to migration, and were also easily partially hydrolyzed to diacylglycerols by pancreatic lipase. (S)-(+)-(1-naphthyl)ethyl urethane (NEU) derivatives of the diacylglycerol mixture derived from the triacylglycerols were fractionated into sn-1, 3-, sn-1, 2- and sn-2, 3-DG-NEU by silica-HPLC and the fatty acid composition of these fractions was analysed. C_{18:109} is distributed evenly in the three positions of TG with C_{18:206} mainly located in sn-2 position, while Δ^5 -unsaturated fatty acids such as $\Delta^{5,9}$ -C_{18:2}, $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3} and $\Delta^{5,11,14}$ -C_{20:3} are exclusively present in the sn-3 position. These results could be confirmed by ^{13}C -NMR spectroscopy : the signals at δ 173.231 ppm and δ 172.811 ppm of the carbonyl carbon of acyl moieties indicate the presence of saturated acids and/or C_{18:109} (oleic acid) in the $\alpha(\alpha')$ - or β -positions, and C_{18:206} including C_{18:109} in the β -position, respectively. In addition, the resonance at δ 173.044 ppm suggested a location of Δ^5 -unsaturated fatty acid moiety in the $\alpha(\alpha')$ -position.

I. 序論

最近에 ^{13}C -NMR spectroscopy¹⁻³⁾, Grignard試藥에 의한 部分加水分解^{4,5)} 및 lipase에 의한 加水分解³⁾로, 數種의 針葉樹 種子에서 얻는 triacylglycerol (TG) 分子에는 Δ^5 -NMDB 脂肪酸이 大部分 sn-1 또는 sn-3에 存在한다는 事實이 確認된 바 있다. 前報⁶⁾에 言及한 바와 같이 잣의 TG의 脂肪酸 組成을 보면, Δ^5 -NMDB 脂肪酸의

含量이 約 20 mol%이고 또 主要한 TG分子에는 그 1分子에 1分子의 Δ^5 -NMDB 脂肪酸이 含有되어 있었다. 이런 報告와 結果들로부터 잣의 TG 分子種에서도 Δ^5 -NMDB 脂肪酸이 存在하면 이 脂肪酸은 glycerol 分子의 外側 位置인 sn-1 또는 sn-3에 存在하고 있지 않을까 推測된다. 萬若 그 렇다면 Δ^5 -NMDB 脂肪酸이 sn-1 位置 또는 sn-3 位置에 熱力學的인 關係에 따라 random하게 分布하고 있는지, 아니면 어느 한 位置에 偏在하고 있

는지 대단히 궁금하며, 더욱이 잣 TG의 생合成 mechanism과 食品化學的, 營養學的 價値를 밝히는데 있어 이런 疑問點은 꼭 풀어야 할 것으로 생각된다. Hilditch⁷⁾와 Brockerhoff⁸⁾는 다음과 같은 方法을 使用하여 TG 分子種의 脂肪酸 分布를 調査하였다. 즉, Grignard 試藥이나 또는 리파제로 TG를 部分加水分解하고, 이 때 얻어진 1, 2-DG와 2, 3-DG를 phosphatidylphenol 誘導體로 만든다. 이 混合物중 1, 2-DG의 誘導體인 1, 2-diacyl-sn-glycerophosphatides에 特異적으로 作用하는 蠍毒(蛇毒)에서 精製한 phospholipase A₂를 作用시켜 1, 2-diacyl-sn-glycerophosphatides의 2-位置의 脂肪酸을 遊離시켜 그 組成을 求한다. 이 때 生成된 1-acyl-lysophosphatides를 TLC나 칼럼 크로마토 그라피(column chromatography)로 未反應의 2, 3-diacyl-sn-glycerophosphatides에서 相互分離하고, 이것을 알칼리로 加水分解하여 1-位置의 脂肪酸 組成을 求한다. 이렇게 얻어진 data와 總脂肪酸 組成을 基礎로 하여 주어진 分式⁹⁾에 依據하여, 1, 2, 3-位置에 結合한 脂肪酸 組成을 計算하였다. 極히 最近에 (S, 또는 R)-(+)-1-(1-naphthyl) ethyl isocyanates를 1, 3-, 1, 2- 및 2, 3-DG 混合物에 作用하여 各各의 diastereomer를 만들어, 이것을 adsorption mode의 HPLC 컬럼으로 1, 3-, 1, 2- 및 2, 3-DG를 相互分離하는 研究가 많이 行하여지고 있다^{10,11)}. ¹³C-NMR spectroscopy는 最近에 butterfat, 植物油, 魚油, 動物油脂 및 硬化油 등의 構成脂肪酸의 組成과 그 分布에 관한 研究에 널리 쓰이고 있다¹²⁾. ¹³C-NMR spectroscopy는 有機化合物에 存在하는 炭素의 同位元素인 ¹³C의 magnetical environment를 測定하여 그 有機化合物의 化學構造를 非破壞적으로 決定하는 分析法 중의 하나다. TG에 結合한 acyl殘基의 各 炭素原子(¹³C)의 chemical shift로부터 그 acyl基(즉, 脂肪酸)를 同定 내지는 定性할 수 있고, 또 그 共鳴 signal의 強度로 그 構成 acyl基를 定量할 수도 있다. 一分子內에 어떤 한 炭素의 chemical shift는 그 炭素의 total environment에 敏感하여 이 炭素로부터 6 또는 그 以上이나 떨어진 原子의 environment에도 影響을 받기도 한다. 예를 들면, oleyl 殘基의 carbonyl 炭素 signal은 炭素原子가 8

個나 떨어진 Δ^9 位置에 있는 二重結合으로부터 影響을 받는다는 것이다. 또 特徵的인 構造을 지닌 炭素 signal (diagnostic signal)의 緩和時間(T₁, relaxation time)을 變化시키고, 測定回數를 增加함으로써 正確한 定量的 data도 얻을 수 있어, 最近에는 TG의 分子種의 定量的 分析 및 磷脂質의 組成이나 分子種 分析에 ¹³C-NMR spectroscopy가 널리 利用되고 있다. Lie等¹²⁾은 飽和脂肪酸이나 또는 olefin系, acetylene系 또는 高度不飽和系 脂肪酸이 包含된 複雜한 TG의 分子種을 ¹³C-NMR spectroscopy로 定量的으로 分析한 바가 있고, Tulloch¹³⁾도 conjugate triene 脂肪酸 殘基를 가진 TG의 分子種을 不飽和基의 異性化없이 짧은 時間에 定量할 수 있다고 하였다. 本 研究에서는 總TG를 Grignard 試藥과 리파제로 部分加水分解하여 얻어진 diacylglycerol (DG)을 (S)-(+)-1-(1-naphthyl)ethyl urethane 誘導體 (NEU-DG)로 만들어, silica 컬럼에서 1, 3-, 1, 2- 와 2, 3-NEU-DG로 分離하였다. 分離된 各 分割의 脂肪酸을 調査하여 잣 TG의 1, 2와 3 位置에 있어서 脂肪酸의 分布, 特히 Δ^5 -NMDB 脂肪酸의 結合位置를 調査하였고 또 이런 結果를 ¹³C-NMR spectroscopy로 確認하였다.

II. 材料 및 實驗方法

1. 材料⁶⁾

잣은 1996년에 收穫한 江原道産으로 釜山 國際市場에서 購入하여 後에 물로 씻고 陰地에서 2日間 말린 後 實驗에 使用하였다.

2. 實驗方法

1). 精製粗脂質抽出 및 TG 精製

粗脂質抽出과 TG 精製는 前報⁶⁾에 言及한 바와 같으며, NMR 測定에 必要한 試料는 眞空데시케터에 넣어 眞空 減壓下에서 殘存溶媒를 完全히 除去한 後에 實驗에 使用하였다.

2). Grignard試藥에 의한 TG의 部分加水分解

TG를 Becker의 方法¹⁴⁾을 若干 修正한 方法에 따라 純粹分離한 TG를 部分加水分解하였다. 즉, TG

30 mg을 試驗管에 옮겨 25 mL의 乾燥한 디에틸 에테르로 完全히 녹이고, 여기에 新鮮하게 製造한 Grignard 試藥인 0.5 M allyl magnesium bromide (디에틸 에테르에 녹여) 1 mL를 加하여 反應液을 正確히 30秒間 攪拌器로 激烈히 攪拌시켰다. 여기에 5 mL의 펜탄 (6 μL 아세트산 含有)과 2 mL의 蒸溜水를 加하여 反應을 停止시키고, 上澄液인 디에틸 에테르層을 다른 試驗管에 옮겨 2 mL의 물로 2回 反復하여 洗滌한 後 無水芒硝로 殘存 水分을 完全히 除去하고, 남은 디에틸 에테르層을 窒素로 減壓 濃縮하여 다음 實驗의 試料로 使用하였다.

3). 胰臟리파제에 의한 TG 分劃의 部分 加水分解

Hayes等의 方法¹⁵⁾을 若干 修正한 方法으로 TG를 部分加水分解하였다. 즉, TG 2~3 mg을 마개 달린 15 mL 試驗管에 옮기고 여기에 Tris buffer (pH 8.0, 1 mL), CaCl₂ (2.2 % 수용액 0.1 mL)와 bile salt solution (0.05% 수용액 0.25 mL)를 加하고 40℃의 水槽上에서 1分間 흔들여 주었다. 이 混合物에 100 單位의 胰臟리파제 (Sigma社)을 加하고 셀로판 테잎으로 試驗管의 마개를 단단히 封한 다음, 攪拌器로 正確히 2分間 攪拌하였다. 에틸알콜 (1 mL)와 6 M 鹽酸 (1 mL)을 反應液에 加하고 反應을 停止시키고, 디에틸 에테르 2 mL와 蒸溜水 1 mL를 加하고 攪拌하면서 DG 混合物을 디에틸 에테르層으로 移行시켰다. 前項에서 言及한 方法과 같이 乾燥 濃縮하여 다음 實驗의 試料로 使用한다.

4). DG의 (S)-(+)-1-(1-naphthyl)ethyl urethane (DG-NEU)화 및 HPLC에 의한 DG-NEU enantiomer의 相互分離¹⁰⁾

위에 言及한 2가지 方法으로 部分 加水分解하여 얻은 DG 混合物을 미리 3 mL의 hexan - 아세톤 (96 : 4, 부피比)으로 活性化시켜 1回用 Bond Elut™ NH₂ 컬럼에 loading하여 10 mL의 hexan - 아세톤 (96 : 4, 부피比)으로 TG를 分離除去하였다. 다음에 10 mL의 hexan - 아세톤 (80 : 20, 부피比)으로 DG와 monoglyceride (MG)를 分離하였으며, 이 混合物의 溶媒를 窒素氣流로 完全히 除去한 다음, 25 μL의 (S)-(+)-1-(1-naphthyl)ethyl isocyanate와 4 mg의 4-pyrrolidinopyridine (1 mL 토루엔에 녹인 後)을 加하고, 50℃에서 하루밤 反

應시켰다. 이 反應液을 冷却시킨 다음 10% taurine 水溶液 100 μL, 디에틸 에테르 10 mL 그리고 蒸溜水 2 mL를 加하여 잘 混和시켜 反應生成物을 디에틸 에테르層으로 移行시켰다 (3回 反復). 디에틸 에테르層을 無水芒硝로 脫水한 다음 窒素 氣流下에서 溶媒를 除去한 다음 얻어진 固形物을 10 mL의 메타놀/물 (95 : 5, 부피比)에 녹이고, 上記 溶媒로 미리 水和시켜 1回用 Bond Elut™ ODS 컬럼에 吸着시켰다. 여기에 同溶媒 15 mL를 흘려 不純物을 完全히 除去한 다음에 10 mL의 아세톤으로 DG-NEU 誘導體를 溶離하였다. 이 아세톤液을 濃縮하여 남은 固形物을 hexan에 녹여 HPLC 分析用 試料로 하였다. HPLC用 컬럼으로 Hypersil (250 × 4.6 mm, 3 μm, HiChrom Ltd., Reading, UK)을 2個 連結하여 使用하였으며, 0.4% propan-1-ol (2% 물 含有)/hexan의 溶媒系로 isocratic하게 試料를 分劃하였다. 이 때 流速은 1.0 mL/min로 하였고, UV-檢出器의 波長은 280 nm에 固定하였다.

5). 脂肪酸의 分析¹⁰⁾

試料의 脂肪酸은 HPLC에서 모은 分劃을 溶媒를 除去하고 남은 殘存物을 0.5 mL의 1, 2-디글로에탄에 녹인 後 1M sodium methoxide-메타놀 (25 μL)과 메틸 아세테이트 (25 μL)를 넣어 50℃에서 1時間 放置하였다. 前報⁶⁾에 言及한 方法으로 FAME를 回收하여 Hewlett Packard 5890 II capillary gas chromatograph로 分析하였다.

6). TG分子의 脂肪酸의 分布決定⁹⁾

TG 分子內의 脂肪酸의 位置分布는 다음 式에 따라 計算하였다.

$$\begin{aligned} \text{sn-1 (mol\%)} &= [3 \times \text{TG (mol\%)}] - [\text{sn-2, 3-DG (mol\%)}] \\ \text{sn-2 (mol\%)} &= [3 \times \text{TG (mol\%)}] - [\text{sn-1, 3-DG (mol\%)}] \\ \text{sn-3 (mol\%)} &= [3 \times \text{TG (mol\%)}] - [\text{sn-1, 2-DG (mol\%)}] \end{aligned}$$

但, 式에서 sn-1, 3-DG (mol%), sn-1, 2-DG (mol%)와 sn-2, 3-DG (mol%)는 Grignard 試藥에 의하여 生成된 DG 混合物을 NEU 誘導體化한 後 HPLC上에서 分劃한 sn-1, 3-DG-NEU, sn-1, 2-DG-NEU와 sn-2, 3-DG-NEU fraction의 構成脂肪酸의 mol%를 表示한 것이다.

Table 1. Distribution of Fatty Acids in the sn-1, sn-2 and sn-3 Positions of Total Triacylglycerol from Composition of Total Triacylglycerols from the Seed Oil of *P. Koraiensis* (mol%)

Fatty acid	Total TG(%)	position						
		1, 3-DG ^a	1, 2-DG ^a	2, 3-DG ^a	sn-1 ^b	sn-2 ^c	sn-3 ^d	sn-2 ^e
C _{16:0}	4.8	6.0	2.2	1.0	12.4	2.4	10.0	1.5
C _{18:0}	2.0	3.1	0.0	0.2	5.6	-0.2	6.0	0.1
C _{18:1ω9}	25.6	24.9	30.5	25.5	25.8	27.0	15.9	27.5
Δ ^{5,9} -C _{18:2}	2.3	3.4	0.3	3.0	0.9	0.1	6.3	0.4
C _{18:2ω6}	46.1	35.5	62.9	44.8	48.7	67.8	12.5	67.2
Δ ^{5,9,12} -C _{18:3}	16.0	23.7	2.9	23.0	2.0	0.6	42.2	0.5
C _{18:3ω6}	0.5	0.4	0.2	0.1	1.3	0.7	1.0	0.6
C _{18:3ω3}	0.2	0.2	0.1	0.0	0.6	0.2	0.4	0.3
C _{20:0}	0.3	0.5	0.0	0.1	0.7	-0.1	0.8	0.1
C _{20:1ω9}	0.9	1.2	0.7	1.0	0.7	0.3	1.3	0.4
C _{20:2ω6}	0.5	0.4	0.1	0.1	1.3	0.7	1.2	0.6
Δ ^{5,11,14} -C _{20:3}	0.8	0.7	0.1	1.2	0.0	1.0	2.3	0.8

*a = NEU derivatives of 1, 3-, 1, 2- and 2, 3-DG obtained after hydrolysis of total TG with a Grignard reagent

b = 3 × TG - 2 × 2, 3-DG, c = 3 × TG - 2 × 1, 3-DG

d = 3 × TG - 2 × 1, 2-DG, e = 2-MG derived from hydrolysis of TG with lipase

7). ¹³C-NMR에 의한 TG의 構成 脂肪酸의 regio-specific한 分析¹⁶⁻¹⁹⁾

¹³C-NMR spectrometer의 器種은 Fourier transform mode인 Bruker AC 300MHz이였으며 試料를 2 mL의 CDCl₃에 녹이고 内部標準物質인 TMS를 添加하여 25℃에서 測定하였다. Chemical shift는 TMS의 signal을 zero로 하여 downfield ppm으로 表示하였다. Pulse의 角度는 45°로 하였고, pulse delay는 25 sec로 하였으며, aquisition number는 2,000으로 하였다. Peak의 相對強度는 三角形法으로 計算하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

자 TG의 脂肪酸 分布를 立 特異적으로 分析하여 얻어진 結果를 Table 1에 나타내었다. C_{16:0}, C_{18:0}, C_{20:0}와 같은 飽和脂肪酸은 sn-1과 3 位置에 高루 分布하고 있었으나, C_{18:2ω6}와 C_{18:1ω9}는 sn-2 位置에 제일 많이 分布하고 있었고, 그 다음으로 sn-1

位置 > sn-3 位置의 順으로 非對稱적으로 分布하고 있었다. 한편 Δ⁵-NMDB 脂肪酸은 sn-2 位置나 sn-1 位置에는 거의 存在하지 않았고 (2~3 mol% 未滿) sn-3 位置에 偏在하여 있었다. Δ^{5,9,12}-C_{18:3}은 sn-3 位置 脂肪酸의 42.4 mol%나 차지하였고 Δ^{5,9}-C_{18:2}는 6.3 mol% 그리고 Δ^{5,11,14}-C_{20:3}는 2.3 mol%나 차지하여 Δ⁵-NMDB 脂肪酸

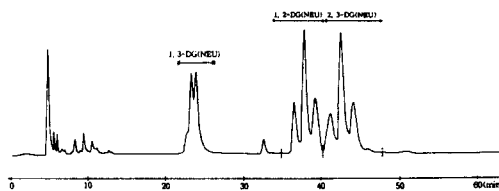


Fig. 1. Chromatograms of the (S)-(+)-(1-naphthyl)ethyl carbamates of 1, 3-DG, 1, 2-DG and 2, 3-DG Derived from Partial Deacylation with a Grignard Reagent

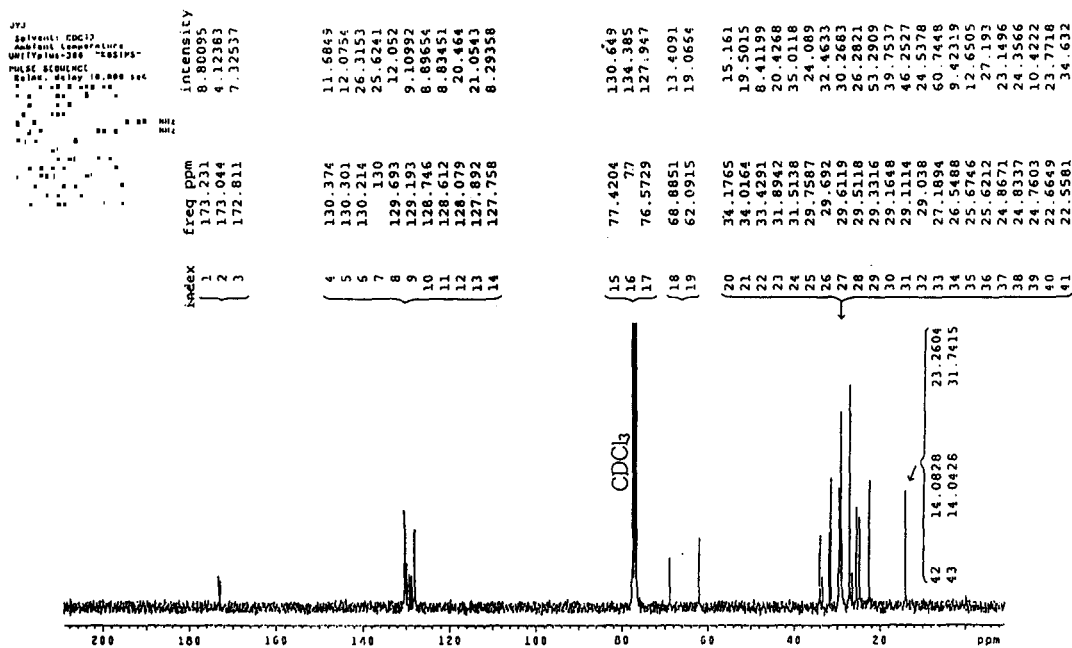


Fig. 2. ¹³C-NMR Spectrum of TG Isolated From P. Koraiensis Seed Oils

이 sn-3 位置에 50 mol% 以上 차지하고 있었다. Fig. 1의 HPLC 크로마토그램에서 分離된 1, 2-DG NEU 와 2, 3-DG NEU의 peak가 非對稱性을 나타낸 것은 이런 事實을 뒷받침하고 있다. 또 sn-2 位置의 脂肪酸 組成을 Grignard 試藥을 處理하여 計算한 값과 臍臟 리파제로 處理하여 直接 얻은 값을 比較하면 큰 差異가 없음을 알 수 있으나, Grignard 試藥을 處理했을 때 C_{18:0}이나 C_{20:0}과 같이 含量이 낮은 脂肪酸이 負의 값을 나타낸 것은 脂肪酸의 分子內 移動 때문이라고 생각된다. Wolff 等²⁰도 זאת을 包含한 針葉樹의 種子油 TG에 存在하는 Δ^5 -NMDB 脂肪酸은 sn-3 位置에 偏在 해 있다고 밝힌 바 있다.

Proton을 decoupling시켜 얻은 자 TG의 ¹³C-NMR 스펙트라에서 Fig. 2와 같이 35개의 共鳴 signal을 얻을 수 있었다. 이 스펙트라에서 TG의 脂肪酸의 構造와 分布에 關한 情報를 얻을 수 있는 領域은 C-1 carbon shift 領域 (大略 δ 174 ppm), C-2 carbon shift 領域 (大略 δ 34 ppm), C-3 (大略 δ 24 ppm)과 allylic (δ 20~ δ 27 ppm), ω -1 (大略 δ 14 ppm), ω -2 (大略 δ 22 ppm), ω -3 (大略

δ 24 ppm)의 carbon shift 領域 그리고 마지막으로 olefinic carbon shift 領域 (大略 δ 127~ δ 132 ppm)이다. 總 TG의 스펙트럼에서 C-1 carbon shift 領域에서 δ 172.811, δ 173.044 및 δ 173.231 ppm의 3개의 signal이 觀察되었는데, δ 172.811와 δ 173.231 ppm의 chemical shift의 差 (Δ^{δ})가 0.42 ppm ($\Delta^{\delta} = \delta$ 173.231 - δ 172.811) 이었다. 이 값은 매우 重要한 數値로서 2개의 칼보닐 (carbonyl) 炭素가 짝을 이루워 글리세롤의 $\alpha(\alpha')$ -와 β -位置에 ester化되어 있음을 意味하고 있고, 또 글리세롤의 $\alpha(\alpha')$ -炭素는 電子에 의하여 (α, α' -炭素는 β -炭素보다 隣接한 水素 -geminal hydrogen- 가 하나 더 많음) β -炭素보다 遮弊化 (shielded)되어 있으므로, $\alpha(\alpha')$ -炭素에 結合되어 있는 acyl基의 C-1 carbon shift는 보다 高磁場에서 나타난다. 즉, δ 172.811 ppm은 $\alpha(\alpha')$ -位置에 存在하는 C-1 炭素의 共鳴 signal에, δ 173.231 ppm은 β -位置에 存在하는 C-1 炭素의 共鳴 signal에 該當된다. 다음에 $\alpha(\alpha')$ -位置과 β -位置에 어떤 acyl基가 ester化되어 있는가는 Gunstone^{1,21-23}과 Lie Ken Jie^{12, 24-27}의 資料에 依存하였다. 이들의

Table 2. Chemical Shifts for Carbon Atoms of Δ^9 - and Δ^5 -unsaturated Acyl Chains of Some TG Species from the Seed Oils of P.Koraiensis

Carbon No.	P. koraiensis total TG	fr. 14*	fr. 16*	Ref. (47)	Remark
Glycerol β -	68.8851	68.820	68.850	68.87	C ₁₈₂ ω 6
α -	62.0515	62.110	62.09	62.09	C ₁₈₁ ω 9
		62.149	62.153		$\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
C-1, β -	172.811	172.817	172.822	172.80	C ₁₈₂ ω 6
α -	173.231	173.228	173.21	173.21	C ₁₈₁ ω 9
	173.044	173.060	173.052		$\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
C-2, β -	34.1765	34.1765	34.1793	34.18	C ₁₈₂ ω 6, C ₁₈₁ ω 9
α -	34.0164	34.0158	34.02	34.02	C ₁₈₁ ω 9, C ₁₈₂ ω 6
	33.4291	33.4322	33.4280	33.42	$\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
C-3, β -	24.8671	24.888	24.851	24.85	C ₁₈₁ ω 9, C ₁₈₂ ω 6
α -	24.8337	24.8344	24.8325		C ₁₈₁ ω 9, C ₁₈₂ ω 6
	24.7603	24.7597	24.7602	24.76	$\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
ω -1		14.136		14.13	C ₁₈₁ ω 9
	14.0828	14.097	14.100	14.09	$\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
	14.0428	14.298	14.287		C ₁₈₂ ω 6
ω -2	22.6549	22.658		22.70	C ₁₈₁ ω 9
	22.5581	22.567	22.570	22.59	C ₁₈₂ ω 6, $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
ω -3	31.8942	31.943		31.92	C ₁₈₁ ω 9
	31.5138	31.545	31.532	31.53	C ₁₈₂ ω 6, $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
Allylic	29.7587	29.736	29.744		C-12 of C ₁₈₁ ω 9
	29.6930	29.682	29.688		C-7 of C ₁₈₂ ω 6
	29.6119	29.599			C-14 of C ₁₈₁ ω 9
	29.5118	29.530	29.517		C-7 of C ₁₈₁ ω 9
					C-13 of C ₁₈₁ ω 9
	29.3316	29.313	29.318		C-15 of C ₁₈₁ ω 9, C ₁₈₂ ω 6, $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
	29.1648	29.170	29.188		C-5 of C ₁₈₁ ω 9, C ₁₈₂ ω 6
	29.1114	29.105	29.112		C-4, 6 of C ₁₈₁ ω 9
	26.5488				C-4, 6 of C ₁₈₂ ω 6
					C-8, 11 of C ₁₈₁ ω 9
	27.1894	27.197	27.187		C-12 of C ₁₈₂ ω 6
					C-7, 8, 14 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
	26.5488	26.521	26.529	26.55	C-4 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
	25.6746	25.622	25.615	25.63	C-11 of C ₁₈₂ ω 6
	25.6212				C-11 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
Olefin in Oleic-linoleic					
	130.214	130.182	130.220	130.19	C-13 of C ₁₈₂ ω 6
					C-10 of C ₁₈₁ ω 9
	130.130	129.980	129.976	129.98	C-9 of C ₁₈₂ ω 6 (β)
	129.693	129.692		129.69	C-9 of C ₁₈₁ ω 9 (α)
	128.079	128.095	128.089	128.07	C-10 of C ₁₈₂ ω 6 (β)
	127.882	127.930	127.883	127.88	C-12 of C ₁₈₂ ω 6 (β)
Olefin in $\Delta^{5,9,12}$ -18:3, $\Delta^{5,9}$ -18:2, $\Delta^{5,11,14}$ -20:3					
	130.374	130.353	130.358	130.37	C-6 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3} , $\Delta^{5,9}$ -C _{18:2}
	130.301	130.310	130.309	130.29	C-13 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
					C-11,15 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
	129.193	129.192	129.197	129.19	C-5, 9 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3} , $\Delta^{5,9}$ -C _{18:2}
	128.746	128.739	128.740	128.75	C-10 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}
	128.612	128.615	128.609	128.61	C-12 of $\Delta^{5,11,14}$ -C _{20:3}
					C-10 of $\Delta^{5,9}$ -C _{18:2}
	127.758	127.721	127.743	127.76	C-12 of $\Delta^{5,9,12}$ -C _{18:3}

* fr. 14 and 16 ; fraction 14 of C_{18:1 ω 9}/ C_{18:2 ω 6}/ $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3} and fraction 16 of (C_{18:2 ω 6})₂/ $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3} species collected from Ag⁺-HPLC (6)

資料에 의하면 飽和脂肪酸이 $\alpha(\alpha')$ -位置에 存在할 때 그 C-1 炭素는 δ 173.233 ppm에서 共鳴한다고 하였고, C_{18:1 ω 9} (oleic acid)가 $\alpha(\alpha')$ -位置 또는 β -位置에 結合되어 있다면 그 共鳴 signal은 δ 173.204 ppm 또는 δ 173.231 ppm에서 나타난다고 하였다. 또 그들은 C_{18:2 ω 6} (lino-leic acid)乃至는 C_{18:3 ω 3} (α -linolenic acid)가 $\alpha(\alpha')$ -位置 또는 β -位置에 ester化되어 있다면 그 칼보닐 炭素는 δ 173.192 ppm 또는 δ 172.791 ppm에서 共鳴한다고 하였다.

本 實驗에서 얻어진 δ 173.231 ppm에서의 signal은 飽和脂肪酸乃至는 C_{18:1 ω 9} (oleic acid)가 $\alpha(\alpha')$ -位置 또는 β -位置에 結合하고 있음을 類推할 수 있고, δ 172.811 ppm은 β -位置에 C_{18:2 ω 6} (linoleic acid)와 C_{18:1 ω 9} (oleic acid)이 存在하여 나타난 signal이라 할 수 있다. δ 173.044 ppm에서 나타난 peak는 $\alpha(\alpha')$ -位置에 結合한 Δ^5 -不飽和脂肪酸의 共鳴 signal이다¹²⁾. 前報⁶⁾의 銀이온-HPLC에서 얻은 fraction 14와 16의 分子種은 各各 C_{18:1 ω 9}/C_{18:2 ω 6}/ $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3} 와 (C_{18:2 ω 6})₂/ $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3} (Fig. 3)인데, Table 2에서 보는 바와 같이 前者의 칼보닐 炭素의 signal중 δ 172.817 ppm에 該當하는 것은 β -位置에 C_{18:2 ω 6}이 結合되어 있음을 나타내며, δ 173.228 ppm의 signal은 $\alpha(\alpha')$ -位置에 C_{18:1 ω 9}가 結合되어 있고, δ 172.060 ppm의 signal은 $\alpha(\alpha')$ -位置에 $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3}의 脂肪酸이 結合되어 있음을 나타내 주고 있다. 後者의 fraction에서 δ 172.822 ppm signal은 亦是 β -位置에 C_{18:2 ω 6}이 結合되어 있음을 나타내 주고 있고, δ 172.052 ppm은 $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3} 脂肪酸이 α (또는 α')-位置에 存在하고 있음을 말해 주고 있다. 總 TG의 스펙트라에서 칼보닐 炭素중 C_{18:1 ω 9와 C_{18:2 ω 6}의 共鳴 signal만 觀察되는 것은 칼보닐 基의 ¹³C의 T1 (relaxation time)이 다른 ¹³C에 比하여 길기 때문에 그 peak intensity는 一般的으로 작아, 含量이 적은 脂肪酸의 칼보닐 基의 ¹³C는 잘 나타나지 않기 때문이다. C-2의 ¹³C shift 領域 (大略 δ 34 ppm)에서는 δ 34.1765, δ 34.0164와 δ 33.4291 ppm에서 3個의 signal이 나타났는데, 앞의 2 peak는 그 chemical shift의 差 (Δ^{δ})가 0.1601 ppm이므로 2 acyl基가 짝을 이루워 글리세롤의 β -位置와}

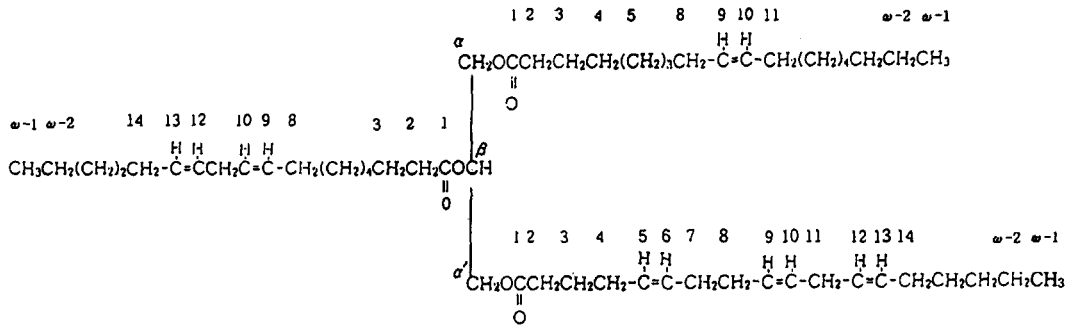


Fig. 3. Chemical Structure of Triacylglycerol Species of sn-1-C_{18:1ω9}, sn-2-C_{18:2ω6}, sn-3-Δ^{5,9,12}-C_{18:3} Species

α-位置에 存在하고 있음을 알 수 있고, Lie 等^{3, 12, 25)}은 triolein과 trilinolein의 ¹³C에 關한 model 實驗을 通하여 β-位置에 存在하는 C_{18:1ω9}와 C_{18:2ω6}의 C-2 位置의 炭素는 δ34.206과 δ34.190 ppm에서 共鳴한다고 하였고, α(α')-位置에 存在하면 δ 34.041 ppm과 δ34.025 ppm에서 共鳴한다고 하였다. 本 實驗에서 觀察된 δ34.1765 ppm은 β-位置에 C_{18:2ω6}가 存在함을 나타내주며, δ34.0164 ppm signal은 α-位置에 C_{18:1ω9}와 C_{18:2ω6}를 爲始한 여러 不飽和脂肪酸이 混存하고 있음을 나타내주고 있다. Fraction 14의 ¹³C-NMR에서 觀察된 共鳴 signal중 fraction 16의 分子種에서는 보이지 않는 δ34.0158 ppm의 peak는 α(α')-位置에 存在하고 있는 C_{18:1ω9}의 C-2 炭素의 共鳴 signal이며, δ 33.4322 ppm에서 signal은 α(α')-位置에 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}, Δ^{5,11,14}-C_{20:3} 및 Δ^{5,9}-C_{18:2}와 같은 Δ⁵-脂肪酸의 C-2 炭素에서 起因한다고 여겨진다²⁴⁾. C-3, allylic, ω-3, ω-2의 carbon shift 領域은 대단히 複雜하다. 그러나 잣 TG의 脂肪酸 組成을 알고 있으므로 各 signal을 同定할 수 있었다. C-3 炭素의 carbon shift 領域 (大略 δ24 ppm)에서 δ24.8337 ppm은 β-位置에 存在하는 C_{18:1ω9}와 C_{18:2ω6}의 不飽和酸과 α(α')-位置에 結合되어 있는 飽和脂肪酸의 C-3 炭素의 共鳴 signal이다⁽¹⁹⁾. δ24.7603 ppm은 α(α')-位置에 存在하는 C_{18:1ω9}, C_{18:2ω6}와 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 C-3 共鳴 signal이고, δ26.5488 ppm은 Δ⁵-脂肪酸의 C-4 炭素의 signal이다. 飽和脂肪酸과 不飽和脂肪酸인 C_{18:1ω9}와 C_{18:2ω6}의 ω-3 炭素核의 非遮弊化順인(飽和酸 (δ31.976 ppm) > C_{18:1}

ω9 (δ31.954 ppm) > C_{18:2ω6} (δ31.567 ppm)]를 考慮할 때, ω-3의 carbon shift에서 δ31.8942 ppm과 δ31.5138 ppm은 各各 C_{18:1ω9}와 C_{18:2ω6}의 共鳴 signal이라고 생각되고²⁴⁾, 其他 signal의 assignment는 Table 2에 주어진 바와 같다. Olefin carbon shift의 領域 (大略 δ127~δ130 ppm)을 보면 11個의 signal이 얻어졌는데, δ130.374, δ 130.301, δ129.193, δ128.746, δ128.612과 δ 127.758 ppm의 共鳴 signal은 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}, Δ^{5,9}-C_{18:2}, Δ^{5,11,14}-C_{20:3}의 올레핀 炭素에서 由來된 것이라고 한다²²⁻²⁴⁾. 즉, δ130.374 ppm은 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}와 Δ^{5,9}-C_{18:2}의 C-6 炭素의 signal이고, δ 130.301 ppm은 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 C-13 炭素와 Δ^{5,11,14}-C_{20:3}의 C-11과 15 炭素에서 由來된 것이다. δ129.193과 δ128.746 ppm은 各各 Δ^{5,9}-C_{18:2}와 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 C-5, 9 炭素의 共鳴 signal과, Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 C-10 炭素의 共鳴 signal이다. δ 128.612 ppm은 Δ^{5,9}-C_{18:2}의 C-10 炭素와 Δ^{5,11,14}-C_{20:3}의 C-12 炭素의 共鳴 signal로, δ 127.758 ppm은 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 C-12 炭素의 共鳴 signal로 생각된다. 反面에 δ130.214, δ130.130, δ129.693, δ128.079와 δ127.892 ppm에서 觀察된 共鳴 signal중 δ130.130, δ128.079과 δ 127.892 ppm의 peak는 β-位置에 ester化되어 있는 C_{18:2ω6}의 C-9, C-10과 12 炭素의 共鳴 signal이다. δ130.214와 δ129.693 ppm에서 signal은 α-位置에 ester化되어 있는 C_{18:1ω9}의 C-10과 C-9 炭素의 共鳴에 의한 것이다. 但, δ130.214 ppm에는 C_{18:2ω6}의 C-13 炭素의 共鳴 signal도 重複되어 있

는 것 같다. 잣 TG의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 가장 함량이 높은 $\text{C}_{18:206}$ 은 β -위치에 존재하고 있음을 알 수 있었고, 또 $\text{C}_{18:109}$ 와 $\Delta^{5,9,12}\text{-C}_{18:3}$ 와 같은 Δ^5 -불포화지방산은 α -위치에 편재해 있어立特異的分析的結果와 잘一致하고 있음을 보여주고 있다. 油脂의 TG (적어도 植物性 油脂)는 所謂 phosphatidic acid 經路를 거쳐서 生成되고 있다²⁸⁾. 즉, glycerol-3-phosphate가 glycerol phosphate acyl transferase와 acyl CoA에 의하여 acylation되어 lysophosphatidate로 되고 이것이 다시 acyl transferase와 acyl CoA에 의하여 phosphatidate로 變化한다. 이 phosphatidate는 phosphatase에 의하여 diacylglycerol (DG)로 加水分解되며, 이 때 生成된 DG에 acyl基가 diacylglycerol acyl transferase의 觸媒作用에 의하여 sn-3 位置에 ester化하여 TG가 生成된다. 이 反應에 關與하는 酵素들은 triacylglycerol synthetase complex의 形態로 細胞의 小胞體(endoplasmic reticulum)의 膜에 結合되어 있다고 한다. 이런 事實과 本實驗의 結果에서 잣 TG에 多量으로 存在하는 Δ^5 -NMDB 脂肪酸이 sn-1과 sn-2에는 거의 存在하지 않고 sn-3 位置에 偏在하고있는 것은 잣의 TG 生成過程에 關與하고 있는 酵素가 一般的인 植物性 TG合成에 關與하는 酵素와는 몇 가지 다른 特性을 가지고 있음을 말해 주고 있다. 그 特性으로 다음과 같은 것을 생각할 수 있다. 즉, 1 phosphatidic acid의 sn-1과 sn-2 位置를 ester化하는 acyl transferase는 Δ^5 -NMDB 脂肪酸의 Δ^5 -ethylene bond에 대한 親和力을 가지고 있지 못하나, sn-1, 2-DG의 sn-3 位置를 acylation하는 acyl transferase만 그 特性을 가지고 있지 않을까 생각되고, 또 2 glycerol-3-phosphate에서 sn-1, 2-DG 에로의 acylation과 그 다음 段階인 phosphatidate에서 生成된 sn-1, 2-DG가 acylation되어 TG가 生成되는 過程이 細胞內의 서로 다른 compartment에서 이루어질 수 있다라는 생각도 排除할 수 없다²⁹⁾. 위에 言及한 生化學的인 特徵外에 營養生理學的인 側面에서 잣 脂質의 特性을 考察할 必要가 있다고 判斷된다. 잣 脂質의 Δ^5 -NMDB 脂肪酸이 sn-3 位置에 偏在되어 있으므로, 잣 脂質이 消化管을 通過하면서 胰臟 리파제의 作

用을 받아 Δ^5 -NMDB 脂肪酸은 쉽게 加水分解되어 遊離되므로 2-MG의 形態보다 容易하게 吸收될 것으로 推測할 수 있다. 잣 脂質에 많이 含有되어 있는 pinolenic acid ($\Delta^{5,9,12}\text{-C}_{18:3}$)가 쥐의 高脂血症改善에 特別한 效果가 있다는 報告^{30, 31)}와 sciadonic acid ($\Delta^{5,11,14}\text{-C}_{20:3}$)가 生體內에서 arachidonic acid로 轉換될 수 있다는 報告³²⁾外에는 잣 脂質에 關한 營養學的인 研究는 극히 적다. 앞으로 잣 脂質의 營養生理學的 特性에 關한 研究가 보다 系的으로 이루어졌으면 한다.

IV. 結論

잣의 脂質의 트리아실글리세롤을 構成하는 脂肪酸의 글리세롤分子의 位置에 따른 分布를 調査하였다. Allyl bromide를 使用하여 만든 Grignard 試藥은 아실基의 分子內 移動을 일으키지 않았고 트리아실글리세롤을 部分加水分解할 수 있었고, 또 胰臟 lipase도 $\Delta^{5,9,12}\text{-C}_{18:3}$ 의 에스테르結合을 쉽게 加水分解할 수 있었다. Diacylglycerol의 (S)-(+)-(1-naphthyl)ethyl urethane(NEU) 誘導體는 silica 칼럼上에서 sn-1, 3-, sn-1, 2- 와 sn-2, 3 DG-NEU로 分離되었으며, total TG의 構成脂肪酸의 立體特異的 分布를 보면 $\text{C}_{18:109}$ 는 TG의 sn-3 位置에 比較的 高루 分布하고 있었으며, $\text{C}_{18:206}$ 는 주로 sn-2 位置에 分布하였다. 이에 反하여 $\Delta^{5,9}\text{-C}_{18:2}$, $\Delta^{5,9,12}\text{-C}_{18:3}$ 와 $\Delta^{5,11,14}\text{-C}_{20:3}$ 와 같은 Δ^5 -불포화지방산은 sn-3 位置에 壓倒的으로 存在하였다. 이 結果는 ^{13}C -NMR스펙트라에서 證明될 수 있었다. 즉, 잣 트리아실글리세롤의 ^{13}C -NMR 스펙트라에서 飽和脂肪酸 乃至는 $\text{C}_{18:109}$ (oleic acid)가 α (α')-位置 또는 β -位置에 結合하고 있음을 말해 주는 δ 173.231 ppm에서의 signal이 觀察되고, 또 β -位置에 $\text{C}_{18:206}$ (linoleic acid)와 $\text{C}_{18:109}$ (oleic acid)의 存在를 意味하는 δ 172.811 ppm의 signal과 α (α')-位置에 Δ^5 -불포화지방산의 存在를 나타내 주는 δ 173.044 ppm의 signal이 觀察되므로, $\text{C}_{18:206}$ 은 주로 글리세롤의 殘基의 β -位置에, Δ^5 -불포화지방산은 α (α')-位置에 存在하고 있음을 알 수 있었다.

謝 辭

本 研究는 1997年度 韓國科學財團에서 支援한「核
心專門研究」課題 (課題番號KOSEF 971 - 0604 -
022 - 1)로 이루어진 것이며, 著者는 韓國科學財
團 諸位에게 깊은 謝意를 表하는 바 입니다.

引 用 文 獻

1. Gunstone, F. D., Seth, S., and Wolff, R. L., *Chem. Phys. Lipids*, **78**, 89 (1995).
2. Gunstone, F. D. and Wolff, R. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 1611 (1996).
3. Lie Ken Jie, M. S. F., Lam, C. C. and Khisar Pasha, M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 557 (1996).
4. Takagi, T. and Itabashi, Y., *Lipids*, **17**, 716 (1982).
5. Blasie, P., Tropini, V., Farines, M., and Wolff, R. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 165 (1997).
6. 禹 孝京, 趙 鏞桂, 金 成眞, 韓國油化學會誌, **15**, (1998).
7. Hilditch, T. P. and Williams, P. N., *The Chemical Constitution of Natural Fats*, 4th edition, John Wiley & Sons, New York, 1964.
8. Brockerhoff, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 586 (1965).
9. Christie, W. W., *Lipid Analysis*, 2nd edition, pp. 155-164, Pergamon Press, Oxford, 1982.
10. Santinelli, F., Damiani, P. and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 552 (1992).
11. Christie, W. W., *High Performance Liquid Chromatography and Lipids*, pp. 172-210, Pergamon Press, Oxford, 1987.
12. Lie Ken Jie, M. S. F., Lam, C. C. and Yan B. F. Y., *Chem. Phys. Lipids.*, **78**, 1 (1995).
13. Tulloch, A. P., *Lipids*, **17**, 544 (1982).
14. Becker, C. C., Rosenquist, A., and Hoelmer, G., *Lipids*, **28**, 147 (1993).
15. Hayes, D. G. and Kleiman, R., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 555 (1993).
16. Lapidot, A. and Gopher, A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 27198 (1994).
17. Sequin, U. and Scott, A. I., *Science*, **186**, 101 (1974).
18. Jones, J. A., Sherry, A. D., Jeffrey, F. M. H., Storey, C. J. and Malloy, C. R., *Biochemistry*, **32**, 12240 (1993).
19. Shulman, R. G., Brown, T. R., Urgubil, K., Ogawa, S. Cohen, S. M. and Clark, D. S., *Biotech. Bioeng.*, **43**, 1059 (1994).
20. Wolff, R. L., Dareville, E. and Martin, C. - J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 515 (1997).
21. Gunstone, F. D., *J. Am. Oil Chem Soc.*, **70**, 965 (1993).
22. Gunstone, F. D., *Chem. Phys. Lipids*, **56**, 201 (1990).
23. Gunstone, F. D., *Chem. Phys. Lipids*, **58**, 159 (1991).
24. Gunstone, F. D., *Advances in Lipid Methodology-2* (ed. by Christie, W. W.), pp. 1-68, The Oily Press, Dundee, 1993.
25. Lie Ken Jie, M. S. F. and Lam, C. C., *Chem. Phys. Lipids*, **78**, 15 (1995).
26. Lie Ken Jie, M. S. F., Lam, C. C. and Yan B. F. Y., *J. Chem. Res.*, (S) 12-13, (M) 250 (1992).
27. Knothe, G., Lie Ken Jie, M. S. F., Lam, C. C. and Bagby, M. O., *Chem. Phys. Lipids*, **77**, 187 (1995).
28. Stryer, L., *Biochemistry*, 3rd edition, pp. 547-548, W. H. Freeman and Company, New York, 1988.

29. Pollard, N. R. and Stumpf, P. K., *Plant Physiol.*, **66**, 649 (1980).
30. Ikeda, I., Oka, T., Koba, K., Sugano, M. and Lie Ken Jie. M. S. F., *Lipids*, **27**, 500 (1992).
31. Sugano, M., *INFORM*, **6**, 505 (1995).
32. Berger, A. and German, J. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **1085**, 371 (1991).